

AUS DEM INSTITUT FÜR HÄMATOLOGIE
DER GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN - UND UMWELTFORSCHUNG
NEUHERBERG

KOMM. DIREKTOR: PRIV.-DOZ.DR.S.THIERFELDER

DER EINFLUSS VON HETEROLOGEM A L S AUF KOLONIEBILDENDE
ZELLEN (CPU) IN KNOCHENMARK, MILZ UND PERIPHEREM
BLUT DER MAUS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Jochen Abb
aus Bad Kissingen

München 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.S.THIERFELDER

Mitberichterstatter: Prof.Dr.R.Marx

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.12.73



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	2
Material und Methoden	5
Versuchstiere	
Antilymphozytenserum	
Zellsuspensionen	
CFU-Kultur-Methode	
Ergebnisse	12
1. Wirkung von ALS auf koloniebildende Zellen im Knochenmark	
a) Versuche mit unbehandelten Tieren	12
b) Versuche mit ALS-behandelten Tieren	14
2. Wirkung von ALS auf koloniebildende Zellen in der Milz	
a) Versuche mit unbehandelten Tieren	17
b) Versuche mit ALS-behandelten Tieren	19
3. Wirkung von ALS auf koloniebildende Zellen im peripheren Blut	
a) Versuche mit unbehandelten Tieren	22
b) Versuche mit ALS-behandelten Tieren	23
Diskussion	27
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	43

Einleitung

Levey und Medawar (1966) beschrieben Antilymphozyten - serum (ALS) als " das stärkste zur Zeit verfügbare immunsuppressive Therapeutikum ". Schon 1963 hatten Woodruff und Anderson gezeigt, daß Ratten nach Behandlung mit ALS allogene Hauttransplantate verzögert abstießen. Ähnliche Beobachtungen machten Monaco et al. (1966 a) bei an Hunden durchgeführten Nierentransplantationen. Auch die nach Zellübertragungen als Ausdruck einer immunologischen Reaktion der Spenderzellen gegen die Gewebsantigene des Empfängers auftretende Sekundärkrankheit konnte durch Vorbehandlung der Spender mit ALS verzögert werden (Thierfelder et al. 1967, Ledney und van Bekkum 1967, Thierfelder et al. 1970).

Morphologisches Zeichen der immunsuppressiven Wirksamkeit von ALS ist die starke Reaktion mit dem lymphatischen System, auf die zahlreiche Autoren hinwiesen (Gray et al. 1966, Anderson et al. 1967, Levey und Medawar 1967, Brendel und Pichlmayr 1967, Jeejeebhoy und Vela-Martinez 1968). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Anwendung von ALS nicht nur zu einem deutlichen Abfall der immunkompetenten Lymphozyten führte, sondern daß auch Nebeneffekte auf Granulozyten (Pichlmayr 1967), Thrombozyten (Thierfelder 1968) und Plasmazellen (Gray et al. 1966, Denman und Frenkel 1968 b, Taub und Lance 1968)

feststellbar waren. Monaco und Mitarbeiter (1966 b) berichteten über zum Tode führendes " wasting disease " bei Mäusen, die über längere Zeit ALS - Injektionen erhalten hatten. Iwasaki et al. (1967) beschrieben Anämien bei ALS - behandelten Hunden, obwohl die Abwesenheit von Häm - agglutininen im verwendeten Serum nachgewiesen werden konnte. Im Zusammenhang mit diesen die vielseitigen Komponenten der ALS - Wirkung unterstreichenden Befunden fand bald auch der Einfluß auf das hämopoetische System gesteigertes Interesse (Ledney 1967 und 1970, de Meester et al. 1968, Field und Gibbs 1968, Thierfelder et al. 1969, Rodriguez-Paradisi et al. 1971).

Quantitative Aussagen über Stammzellen und damit Zugang zu den aufgeworfenen Fragen erlaubte zunächst die 1961 von Till und McCulloch entwickelte CFU-Milz-Methode. Sie beobachteten, daß die intravenöse Injektion einer geeigneten Zahl von Knochenmarkszellen in isologe, vorheriger supra - letaler Ganzkörperbestrahlung ausgesetzte Empfängertiere die Bildung von deutlich sichtbaren Knoten an der Milz - oberfläche dieser Tiere verursachte. Histologische Untersuchungen ergaben, daß die Knoten aus Kolonien von proliferierendem hämopoetischen Gewebe bestanden (Juraskova und Tkadlecek 1965, Fowler et al. 1969).

Eine wichtige Ergänzung zur in vivo-Technik von Till und McCulloch brachte die von Pluznik und Sachs (1965) und Bradley und Metcalf (1966) eingeführte CFU-Kultur-Methode -

de, die das Wachstum von Kolonien aus Zellsuspensionen von Mäuseknochenmark in Agarnährmedium beschreibt. Auf eine enge Verwandtschaft zwischen den in Kulturen koloniebildenden Zellen und den für die Bildung exogener Milzkolonien verantwortlichen hämopoetischen Stammzellen (Wu et al. 1968, Sutherland et al. 1970, Dicke et al. 1971) gibt es mehrere Hinweise :

1. Ihre Fähigkeit zur extensiven Proliferation (Becker et al. 1963, Fowler et al. 1967, Metcalf et al. 1967, Barnes et al. 1968, Paran und Sachs 1969).
2. Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Siminovitch et al. 1963, Lewis und Trobaugh 1964, Pluznik und Sachs 1965).
3. Ihre Fähigkeit zur granulopoetischen Differenzierung (Lewis und Trobaugh 1964, Bradley und Metcalf 1966, Ichikawa et al. 1966, Wu et al. 1967).

Diese gemeinsamen Eigenschaften erklären die mehrfach berichtete Übereinstimmung der Ergebnisse im in vivo- und in vitro-System. Die CFU-Kultur-Methode bildete die Grundlage für die hier angestellten Untersuchungen über die Wirkung von ALS - Behandlung auf koloniebildende Stammzellen in Knochenmark, Milz und peripherem Blut von C3H - Mäusen.

Material und Methoden

Versuchstiere

C3H-Mäuse wurden von den Laboratorien der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, bezogen. Die zum Zeitpunkt der Versuche 9 - 11 Wochen alten Tiere waren in Plastikkäfigen untergebracht und hatten freien Zugang zu Wasser und zum Standardfutter (Altromin). Kaninchen wurden von einem ortsansässigen Händler geliefert.

Antilymphozytenserum

Für alle Versuche wurde Kaninchen-anti-Maus-Lymphozytenserum verwendet (ALS). Das Serum wurde nach einer von Gray et al. (1966) angegebenen Methode hergestellt, jedoch ohne Gebrauch von Freundschem Adjuvans.

Lymphknotenzellen wurden aus den submandibulären, axillären, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten von CBL-Mäusen erhalten. Um die Zellausbeute zu verbessern wurden diesen Mäusen eine Woche vor der Zellpräparation jeweils 1×10^6 Milzzellen von Mäusen einer im Tierstall des Hämatologischen Instituts spontan aufgetretenen lymphatischen Leukämie übertragen. Kaninchen wurden mit 1×10^8 dieser Lymphknotenzellen intravenös immunisiert und drei Wochen später an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 1×10^8 Lymphknotenzellen geboostert. Vier Tage später wurden die Kaninchen entblutet. Nach Absetzen des Blut -

kuchens bei 4 Grad C wurde das überstehende Serum mit einer Pipette abgehoben und zweimal 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Auf diese Weise wurde die Kontamination mit zellulären Bestandteilen vermieden. Zur Sterilisation wurde das Serum mit Na - Merthiolat in der Konzentration 1:10000 (ein Tropfen auf 5 ml Serum) versetzt. Die gewonnenen Antilymphozytenserum von jeweils 6 Kaninchen wurden gepoolt und bis zum Gebrauch bei -20 Grad C aufbewahrt. Für die Versuche verwendet wurden Pool 90, 99, 104, die jeweils einen mit der Komplementbindungsreaktion bestimmten Lymphotoxizitätstiter von 1:256 aufwiesen.

Zellsuspensionen

1. Knochenmark

Femora und Tibiae jeder Versuchsmouse wurden freipräpariert und ihre Enden mit Scheren durchschnitten. Vorsichtig wurde eine Nadel bis in die Mitte des Knochenschafts eingeführt und einige Tropfen CMRL 1066 - Kulturmedium durch die Nadel gespritzt. Das ausgeschwemmte Knochenmark wurde in einer Petrischale aufgefangen und einige Male auf- und abpipettiert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten.

2. Milz

Die Milz derselben Mäuse wurde sorgfältig mit Scheren zerteilt und in einigen ml CMRL 1066 durch kräftiges Pipettieren in Suspensionen einzelner Zellen übergeführt.

3. Peripheres Blut

Den Versuchstieren wurden 10 Minuten vor der Blutentnahme 0,15 ml Heparin (1000 E/ml) intraperitoneal injiziert. Das nach Entfernung von Sternum und Lungenflügeln aus dem Thoraxhohlraum gewonnene Blut wurde 1:1 mit CMRL 1066 verdünnt und nach dem von Hulliger und Blazkovec angegebenen Verfahren zur Leukozytenseparation (1967) über einen Methylcellulose-Natrium-Metrizoat-Gradienten geschichtet. Methylcellulose (Methocel 25 cps, Dow Chemical Co.) wurde als 2 %-ige Lösung in destilliertem Wasser, Natrium-Metrizoat (Ronpacon, Cilag-Chemie AG) als sterile Lösung in Handelsform verwendet. Methylcellulose und Natrium-Metrizoat wurden im Verhältnis 16:10 gemischt; die entstandene Lösung hatte eine spezifische Dichte von 1,08. Die Gradientenlösung wurde in Glasröhrchen bis zu einem Durchmesser von 2 cm pipettiert; Blasenbildung wurde sorgfältig vermieden. Das gewählte Volumen sollte eine etwa 2 cm hohe Säule ergeben. 4 bis 6 ml des verdünnten Bluts wurden ohne Zerstörung der Grenzschicht zugegeben. Etwa 45 Minuten wurden die Glasröhrchen in aufrechter Position bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann wurde der leukozytenreiche Überstand bis nahe an die Trennschicht abpipettiert und 15 Minuten bei 1800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit CMRL 1066 wurden die Zellen in einigen ml CMRL 1066 resuspendiert und für die Versuche verwendet.

Zellzählung

Die Auszählung der Zellen wurde mit einem Großfeldmikroskop (Leitz Orthoplan) bei 25-facher Vergrößerung vorgenommen.

CFU - Kultur - Experimente

Die Aussagen über die Koloniebildung von Stammzellen in Kulturen beruhen auf der Versuchsanordnung von Worton et al. (1969), die sich vom Nährschichtsystem in weichem Agar (Pluznik und Sachs 1965, Bradley und Metcalf 1966) ableitet. Bei den Experimenten wurde eine Methylcelluloselösung anstatt des Agar (Ichikawa et al. 1966) und konditioniertes Medium aus Mäuse-L-Zellkulturen statt Nährschichten benutzt.

Die Kulturplatten enthielten folgende Substanzen:

Die zu untersuchenden Zellen in CMRL 1066-Medium mit 0,8 % Methylcellulose (Methocel 4000 cps, Dow Chemical Co.), 10 % fetales Kälberserum (Flow Laboratories, Rockville, Maryland), 10 % konditioniertes Medium von Mäuse-L-Zellen, 2 % bovines Serumalbumin (fraction V powder, Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri), 20 Mikrogramm L-Asparagin/ml (General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio) und 100 Mikrogramm Penicillin-Streptomycin/ml (Difco Lab., Detroit, USA). Diese Suspension wurde in gleichen Teilen von je 1 ml auf Plastik-Petrischalen (Greiner, Nürtingen, Durchmesser 35/10 mm) verteilt. Je zwei Kulturschalen wurden mit einer dritten

5 ml destilliertes Wasser enthaltenden in einer großen Glaspetrischale bei 37 Grad C in einem Brutschrank mit feuchter Luft und 5 %-iger Kohlendioxidatmosphäre inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Kolonien, die von mehr als 50 Zellen gebildet wurden, mit einem umgekehrten Mikroskop ausgezählt.

Die Methylcellulose wurde durch Auflösen von 16 g Methocel in 500 ml heißem (90 - 100 Grad C), destilliertem Wasser hergestellt. Dieser Vorgang ergab eine starke Volumenzunahme. Nach Abkühlen der Lösung wurden 500 ml kaltes, zweifach konzentriertes CMRL 1066 hinzugefügt. Die entstandene 1,6 %-ige Lösung wurde vor dem Gebrauch mindestens 48 Stunden bei 4 Grad C aufbewahrt. Diese Grundlösung wurde bei 4 Grad C bis zu einem Monat gelagert und bei den Kulturen in 0,8 %-iger Endkonzentration verwendet.

Die Bildung von Kolonien durch Zellen aus hämopoetischen Organen kann durch ausreichende Stimulation begünstigt werden (Metcalf 1970). Diese Stimulation der Kulturen wird durch Zugabe von koloniestimulierender Aktivität bewirkt, die gewonnen wird

1. aus Zellnährschichten (Pluznik und Sachs 1965, Bradley und Metcalf 1966, Metcalf 1967).
2. aus menschlichem Urin (Robinson et al. 1969, Stanley et al. 1970).

3. aus einigen menschlichen und Mäuseseren (Bradley et al. 1967, Metcalf et al. 1967, Metcalf und Foster 1967 a und b, Robinson et al. 1967, Foster et al. 1968 a und b, Chan und Metcalf 1970, Chan et al. 1971, Metcalf et al. 1971).
4. aus konditioniertem Medium verschiedener Zellkulturen (Pluznik und Sachs 1966, Ichikawa et al. 1967, Bradley und Sumner 1968, Paran und Sachs 1968, Paran et al. 1969 und 1970, Iscove et al. 1971, Stanley et al. 1971).

Die Eigenschaften des Faktors, der für die koloniestimulierende Aktivität in L-zellkonditioniertem Medium verantwortlich ist, wurden von Austin et al. (1970) beschrieben. Das hier benutzte Medium wurde nach Worton et al. (1969) aus Einschichtkulturen von Mäuse-L-Zellen hergestellt. Eine 200 ml Glasflasche (Kimax, USA), die 80 ml CMRL 1066 mit 10 % fetalem Kälberserum enthielt, wurde mit 6×10^5 Mäuse-L-Zellen pro ml beschickt. Nach 7 Tagen wurde das Medium entfernt, durch ein 0,45 Millipore-Filter filtriert und bei 4 Grad C bis zu zwei Monaten aufbewahrt. Bei den Versuchen wurde das konditionierte Medium in 10 %-iger Konzentration verwendet.

BSA (bovines Serumalbumin) - Grundlösungen wurden durch Auflösen von 1000 g BSA in 1,82 l destilliertem Wasser erhalten. Das Volumen stieg dabei auf etwa 2,5 l und ergab eine 40 %-ige Lösung. Diese Lösung wurde durch zweimaliges Zugabe und Entfernen von 100 g Austauschharz

(AG-501-X8 (D), Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) deionisiert. Dann wurde die Lösung 12 Stunden bei 1000 g zentrifugiert, durch ein 0,45 Millipore-Filter filtriert und in 30 ml-Mengen bei -20 Grad C aufbewahrt. Für jedes Experiment wurde eine Flasche aufgelöst und durch Zugabe von 2,2 ml einer zehnfach konzentrierten phosphat - gepufferten Salzlösung (ohne Kalzium- und Magnesium-Ionen) isotonisch gemacht. Dies ergab eine isotone Lösung von ungefähr 37 %-igem BSA bei einem pH von 5,4.

Um die anfangs aufgetretene Verunreinigung der Kulturen mit Pilzen zu vermeiden, wurde das Mykostatikum Acti-dione (Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan) in einer Konzentration von 143 mg/ 100 ml CMRL 1066 hinzugefügt.

Ergebnisse

1. Wirkung von ALS auf koloniebildende Stammzellen im Knochenmark

a) Versuche mit unbehandelten Tieren

In der ersten Versuchsserie am 22.2.1972 wurden drei Experimente mit unbehandelten C3H-Mäusen durchgeführt. Jede Kulturschale enthielt 1×10^6 Knochenmarkszellen pro ml Medium. Die in Tabelle 1 dargestellten Werte geben daher die Koloniezahlen pro 1×10^6 angesetzte Zellen an.

Tabelle 1 (Versuchsserie vom 22.2.72)

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
168	165	173
171	170	176
174	162	169
172	166	174
167	168	173
169	175	168
165	173	175
173	171	169
164	169	171
167	172	170
$169,0 \pm 3,4$	$169,1 \pm 4,0$	$171,8 \pm 3,6$

Die Kontrollexperimente vom 24.2. bzw. 10.5.72 ergaben die in Tabelle 2 bzw. 3 nachgewiesenen Werte.

Tabelle 2 (Versuchsserie vom 24.2.72)

Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
181	183	176
176	187	179
179	190	179
182	176	181
177	185	177
176	187	173
174	186	180
179	180	175
176	179	177
179	184	178
177,9 $\pm$ 4,8	183,7 $\pm$ 11,9	177,5 $\pm$ 14,5

Tabelle 3 (Versuchsserie vom 10.5.72)

Versuch 7	Versuch 8	Versuch 9	Versuch 10
179	180	177	171
184	178	176	176
173	175	172	179
186	178	185	175
188	182	187	181
180	176	183	184
174	179	179	182
181	176	184	177
183	180	180	179
181	175	184	177
180,9 $\pm$ 12,3	177,9 $\pm$ 15,9	180,7 $\pm$ 13,7	178,1 $\pm$ 12,8

Der Gesamtdurchschnittswert aus den zehn Versuchen mit unbehandelten Tieren beläuft sich auf $176,7 \pm 9,4$ Kolonien pro 1×10^6 Knochenmarkszellen.

b) Versuche mit AIS-behandelten Tieren

Die verwendeten C3H-Mäuse erhielten an sechs aufeinander folgenden Tagen jeweils 0,25 ml AIS intraperitoneal gespritzt; 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der ersten AIS-Versuchsserie vom 29.2.72 (in Kolonien/ 1×10^6 Knochenmarkszellen).

Tabelle 4 (Versuchsserie vom 29.2.72)

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
93	84	82
89	87	81
86	88	86
85	83	84
86	82	84
88	84	85
84	83	82
89	83	83
90	84	80
$87,5 \pm 3,3$	$84,3 \pm 2,9$	$83,0 \pm 1,8$

Bei den am 2.3. bzw. 10.5.72 durchgeführten Kontrollexperimenten wurden die in Tabelle 5 bzw. 6 beschriebenen Werte ermittelt.

Tabelle 5 (Versuchsserie vom 2.3.72)

Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
83	86	85
85	85	87
87	84	84
82	85	89
83	87	91
84	84	87
84	83	88
83	85	89
85	86	86
82	82	87
83,8 $\pm$ 2,6	84,7 $\pm$ 2,4	87,3 $\pm$ 2,5

Tabelle 6 (Versuchsserie vom 10.5.72)

Versuch 7	Versuch 8	Versuch 9	Versuch 10
81	84	83	85
89	85	85	87
90	86	82	83
85	85	79	88
86	83	80	90
87	85	84	86
87	84	87	88
88	84	82	88
86	86	82	82
88	83	84	81
86,7 $\pm$ 2,4	84,5 $\pm$ 2,4	82,8 $\pm$ 2,6	85,8 $\pm$ 2,6

Der Durchschnittswert aus den zehn Versuchen mit ALS-behandelten Tieren liegt mit $85,0 \pm 2,6$ Kolonien/ 1×10^6 Knochenmarkszellen deutlich unter dem Kontrollwert ($176,7 \pm 9,4$). Im Knochenmark der Maus lässt sich unter dem Einfluß von ALS eine Abnahme der koloniebildenden Zellen (CFU) um 52,0 % feststellen.

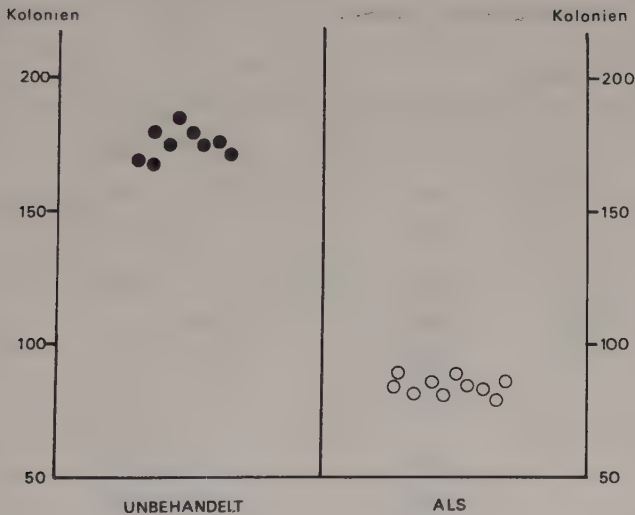


Abbildung 1

Koloniebildende Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkszellen bei unbehandelten und ALS-behandelten C3H-Mäusen.

2. Wirkung von ALS auf koloniebildende Stammzellen in der Milz

a) Versuche mit unbehandelten Tieren

Parallel zur ersten Versuchsserie mit Knochenmarkszellen am 22.2.72 wurden Kulturen mit den Milzzellen dieser Tiere angelegt. Die Konzentration der Zellen pro ml Medium betrug ebenfalls 1×10^6 . Tabelle 7 gibt die bei den Experimenten beobachteten Koloniezahlen wieder.

Tabelle 7 (Versuchsserie vom 22.2.72)

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
67	63	65
66	62	68
64	65	72
69	65	70
70	69	71
72	66	69
64	66	67
63	63	68
63	65	68
65	67	66
66,3 $\pm$ 3,1	65,1 $\pm$ 2,7	68,4 $\pm$ 2,8

Die in Tabelle 8 bzw. 9 aufgeführten Werte wurden bei den Kontrollexperimenten vom 24.2. bzw. 12.5.72 erhalten.

Tabelle 8 (Versuchsserie vom 22.2.72)

Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
66	63	63
64	65	63
64	66	68
67	69	66
63	70	62
62	67	69
65	63	67
65	63	71
63	65	70
64	71	65
64,3 ± 2,7	66,2 ± 2,7	66,4 ± 2,8

Tabelle 9 (Versuchsserie vom 12.5.72)

Versuch 7	Versuch 8	Versuch 9	Versuch 10
65	71	70	68
70	63	67	66
68	68	72	71
64	69	69	73
62	70	64	69
67	66	66	67
66	66	68	67
63	68	65	66
65	64	65	69
63	65	69	70
65,3 ± 2,7	67,0 ± 2,7	67,5 ± 2,7	68,6 ± 2,8

Als Gesamtdurchschnitt aus zehn Versuchen mit unbehandel -
ten Tieren ergeben sich $66,5 \pm 2,8$ Kolonien/ 1×10^6 Milzzellen.

b) Versuche mit ALS-behandelten Tieren

C3H-Mäuse wurden wie oben beschrieben sechs Tage mit ALS-In -
jektionen behandelt. Die Ergebnisse der Experimente vom
29.2.72 sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 (Versuchsserie vom 29.2.72)

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
102	91	93
95	95	97
96	96	98
95	94	94
95	93	94
97	95	93
96	96	94
99	96	95
95	97	92
97	98	95
$96,7 \pm 2,3$	$95,1 \pm 2,2$	$94,5 \pm 2,2$

Die bei den Kontrollversuchen am 2.3. bzw. 12.5.72 erhal -
tenen Koloniezahlen zeigen die Tabellen 11 bzw. 12.

Tabelle 11 (Versuchsserie vom 2.3.72)

Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
95	95	93
98	100	99
99	99	98
96	98	100
97	101	99
98	96	101
96	95	98
95	97	99
98	98	97
99	98	100
97,1 $\pm$ 2,1	97,7 $\pm$ 2,2	98,4 $\pm$ 2,3

Tabelle 12 (Versuchsserie vom 12.5.72)

Versuch 7	Versuch 8	Versuch 9	Versuch 10
89	90	101	96
94	99	97	96
97	95	96	93
92	96	99	99
95	96	102	98
98	93	104	97
97	100	97	95
97	98	95	94
96	95	95	94
95	97	98	92
95,0 $\pm$ 2,5	95,9 $\pm$ 2,5	98,4 $\pm$ 2,6	95,2 $\pm$ 2,6

Der Gesamtdurchschnittswert aus den Versuchen mit C3H-Mäusen, die ALS-Injektionen erhalten hatten, läßt mit $96,4 \pm 2,4$ Kolonien/ 1×10^6 Milzzellen eine erhebliche Steigerung gegenüber den Kontrollwerten ($66,5 \pm 2,8$ Kolonien/ 1×10^6 Milzzellen) erkennen. Unter ALS-Behandlung findet in der Milz ein Anstieg der koloniebildenden Stammzellen um 43,9 % statt.

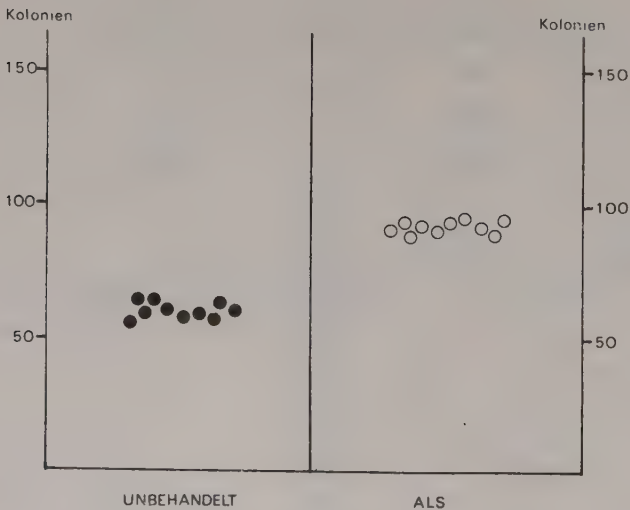


Abbildung 2

Koloniebildende Zellen/ 1×10^6 Milzzellen bei unbehandelten und ALS-behandelten Mäusen.

3. Wirkung von ALS auf koloniebildende Stammzellen im peripheren Blut

a) Versuche mit unbehandelten Tieren

Bei den Untersuchungen wurde das Blut von 12-15 C3H-Mäusen für einen Versuch gepoolt. Nach Separation der Leukozyten (s.o.) wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 /ml Medium auf die Kulturschalen verteilt. Die bei den Versuchsserien vom 14.6. bzw. 21.6.72 erhaltenen Werte zeigen Tabelle 13 bzw. 14.

Tabelle 13 (Versuchsserie vom 14.6.72)

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
123	129	155
114	137	137
137	116	144
122	125	156
109	122	159
117	131	148
120,3 $\pm$ 9,7	126,7 $\pm$ 8,8	149,8 $\pm$ 15,3

Tabelle 14 (Versuchsserie vom 21.6.72)

Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
139	126	138
154	131	143
147	119	129
142	122	131
151	125	135
138	116	140
145,2 $\pm$ 14,7	123,1 $\pm$ 14,2	136,0 $\pm$ 13,1

Als Durchschnittswert der insgesamt sechs Versuch mit unbehandelten C3H-Mäusen errechnen sich $133,5 \pm 13,0$ Kolonien/ 5×10^6 Zellen aus dem peripheren Blut. Dies entspricht einer Koloniezahl von $26,7/1 \times 10^6$ Zellen aus dem peripheren Blut.

b) Versuche mit ALS-behandelten Tieren

Nach ALS-Applikation ergaben sich die in Tabelle 15 bzw. 16 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 15 (Versuchsserie vom 27.6.72)

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
161	172	156
177	176	170
173	184	164
159	163	161
164	171	159
168	168	153
$167,0 \pm 17,1$	$172,3 \pm 19,8$	$160,5 \pm 19,5$

Tabelle 16 (Versuchsserie vom 3.7.72)

Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
186	191	162
191	179	168
177	184	157
175	188	172
183	172	166
188	175	155
$183,3 \pm 22,0$	$181,5 \pm 23,1$	$163,3 \pm 22,5$

Der Durchschnittswert aller sechs Versuche mit ALS-behandelten C3H-Mäusen beträgt $171,4 \pm 20,1$ Kolonien/ 5×10^6 Zellen aus dem peripheren Blut (bzw. $34,3$ Kol./ 1×10^6 Zellen). Bei den unbehandelten Tieren hatte sich ein Wert von $133,5$ Kolonien/ 5×10^6 Zellen errechnen lassen; unter dem Einfluß von ALS war demnach eine Zunahme der koloniebildenden Stammzellen im peripheren Blut um $27,9\%$ nachweisbar.



Abbildung 3

Koloniebildende Zellen/ 5×10^6 Zellen aus dem peripheren Blut bei unbehandelten und ALS-behandelten Mäusen.

Die zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse in Abbildung 4 macht den starken Einfluß von ALS auf hämopoetische Zellen deutlich. Bei den Experimenten hatten sich mit der CFU-Kultur-Methode bei unbehandelten Tieren durchschnittliche CFU-Konzentrationen von etwa $180/1 \times 10^6$ Zellen im Knochenmark, $70/1 \times 10^6$ Zellen in der Milz und $25/1 \times 10^6$ Zellen im peripheren Blut ermitteln lassen.

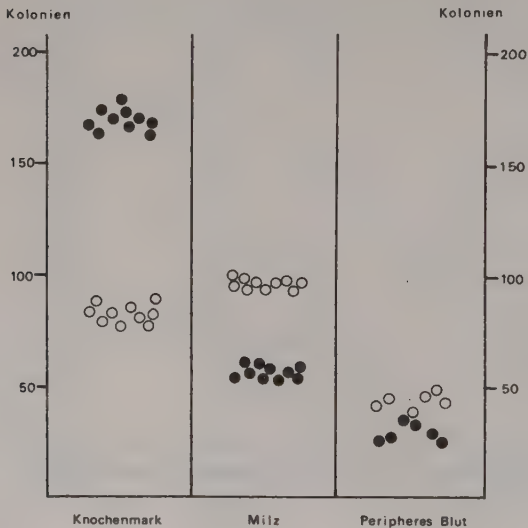


Abbildung 4

Koloniebildende Zellen in Knochenmark, Milz und peripherem Blut bei unbehandelten (schwarze Punkte) und ALS-behandelten (Kreise) Mäusen.

Nach der sechstägigen Behandlung mit ALS (Gesamtmenge 1,5 ml) hatten sich die CFU-Konzentrationen signifikant verändert. Sie betrugen nun annähernd $90/1 \times 10^6$ Zellen im Knochenmark, $100/1 \times 10^6$ in der Milz und $35/1 \times 10^6$ im peripheren Blut.

Im Knochenmark läßt sich nach der Anwendung von ALS eine Abnahme der koloniebildenden Zellen um 50 % feststellen, während der CFU-Gehalt der Milz um 45 % und der des peripheren Bluts um 30 % erhöht ist.

Diskussion

I. Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von ALS

Antilymphozytenserum kann zelluläre Immunreaktionen hemmen. Diese Wirksamkeit zeigt sich in der starken Verminderung der Primärantwort auf Schafererythrozyten nach ALS-Gabe (Gray et al. 1966, Martin und Miller 1968) wie auch in der deutlich verzögerten Abstoßung allogener oder xenogener Hauttransplantate (Levey und Medawar 1966 a, Lance und Medawar 1969). Darüberhinaus läßt sich ein bereits in Gang befindlicher Abstoßungsprozeß aufhalten und die second set - Reaktion verhindern.

Nach diesen Untersuchungen über die funktionelle Wirkung von ALS sollten sich korrelierende morphologische Befunde folgendermaßen darstellen : Die bedeutendsten morphologischen Veränderungen müßten sich in Gebieten nachweisen lassen, die am engsten mit der zellulären Immunreaktivität identifiziert werden können. Turk und Willoughby (1967) konnten diese Erwartungen durch ihre Aussagen über die zentralen und peripheren Effekte von ALS bestätigen. Sie stellten fest, daß Antilymphozytenserum Lymphozyten aus den periarteriolen Bezirken der Milzfollikel und aus den parakortikalen Zonen der Lymphknoten verdrängte. Die betroffenen Gebiete in Milz und Lymphknoten werden nach Parrot et al. (1966) ausschließlich von kleinen thymusabhängigen Lymphozyten besie-

delt, die für die zellvermittelte Immunität verantwortlich sind.

Als Hauptangriffspunkt von ALS sind seit längerer Zeit die peripher zirkulierenden Lymphozyten erkannt (Levey und Medawar 1967, Denman und Frenkel 1968 b, Leuchars et al. 1968). Noch keine Übereinstimmung dagegen wurde bisher über den Wirkungsmechanismus des Antilymphozytenserums erreicht. Nach Meinung einiger Autoren liegt die immunologische Wirkung des Serums in der unterschiedslosen, nicht-selektiven Zerstörung von Lymphozyten. Gray et al. (1966) beobachteten die stark zytotoxische Wirkung von ALS auf Lymphozyten in vitro; Monaco et al. (1966 b) beschrieben einen massiven und nicht-selektiven Abfall der Lymphozyten in der Zirkulation und in zentralen lymphatischen Organen. Jooste et al. (1968) versuchten diese Diskrepanz zu den Befunden anderer Untersucher damit zu erklären, daß die Arbeitsgruppe von Gray bei der Präparation von ALS Freundesches Adjuvans verwendet hatte. Die mit Hilfe von Adjuvantien gewonnenen Seren können hochtoxisch sein und Stresseffekte durch die Ausschüttung von Nebennierenhormonen auslösen. Die Wirkung von ALS aber ist von einer Beteiligung der Nebenniere unabhängig, da sie in adrenalectomierten Tieren vorhanden bleibt (Levey und Medawar 1966). Wenn eine reine Zytotoxizitätstheorie auch heute allgemein abgelehnt wird, so spricht doch das Fehlen einer verzögerten Transplantatabstoßung nach Applikation nichtzytotoxischer Antikörperfragmente des Antilymphozytenserums für einen gewissen Einfluß der zytotoxischen Komponente (Woodruff et al. 1967).

Levey und Medawar (1967) entwickelten eine Theorie, nach der die Wirkung von ALS auf einem " blindfolding " oder " coating " der Lymphozyten beruht. Dabei werden Rezeptoren an der Lymphozytenoberfläche durch Serumproteine abgedeckt und eine Erkennung von Antigenen so verhindert. Unterstützung fanden Levey und Medawar durch Brent et al. (1967), nach deren Behauptung die immunologische Funktionsfähigkeit von Lymphozyten ALS-behandelter Spender wiederhergestellt werden konnte, wenn man Trypsin zugab, das den Proteinhülle auflöste.

Die " blindfolding " - Hypothese wurde von den Promotoren zurückgezogen, als sie beobachteten, daß die Immunkompetenz der Lymphozyten entgegen ihren Erwartungen auch nach wiederholter Zellteilung persistierte (Levey und Medawar 1967). Darüber hinaus ist die schnelle Elimination spezifischer Antikörper aus dem lymphatischen Gewebe und dem Körper der Empfänger unvereinbar mit einer Hüllebildung um die Lymphozyten, da die funktionellen Schäden weit über den Zeitraum des potentiellen coating hinausreichen (Lance 1969).

Weiterführende Versuche brachten Levey und Medawar (1967) zu der Ansicht, daß der Wirkungsmechanismus von ALS über eine " sterile Aktivierung " der immunkompetenten Zellen abläuft. ALS soll eine generalisierte Transformation und Teilung lymphatischer Zellen verursachen, die allen anderen immunologischen Reaktionen vorbeugt oder sie verdrängt. Diese sterile Aktivierung der Lymphozyten soll mit einem Verlust ihrer immunologischen Funktionsfähigkeit einhergehen. Gestützt wird die beschriebene Theorie durch die Beobachtung, daß Antileu-

kozytenseren menschliche Lymphozyten in vitro zur Transforma -
tion anregen können (Gräsbeck et al. 1964). Auch die von
mehreren Autoren beobachtete Hypertrophie des lymphatischen
Systems und die Anwesenheit von Blastenzellen im Gewebe ALS -
behandelter Tiere (Denman et al. 1968, Everett et al. 1970)
werden zur Bestätigung der Auffassung von Levey und Medawar
angeführt.

Die beschriebene Transformationsfähigkeit aber teilt ALS mit
mit einigen anderen Substanzen wie Phytohämagglutinin und
bakteriellen Extrakten, die in vivo keine immunsuppressive
Wirkung entfalten. Sie ließ sich auch nur beim Vergleich von
ALS- und unbehandelten Versuchstieren an Hand histologischer
Untersuchungen nachweisen (Denman und Frenkel 1968 b, Taub
und Lance 1968 b). Wurden ALS-behandelte mit NRS (normales
Kaninchenserum) -behandelten Kontrolltieren verglichen, so
fanden sich annähernd gleiche Zahlen an Blastenzellen (Taub
und Lance 1968 b). Nach Lance (1970) ist das Auftreten von
Blastenzellen und sich beschleunigt teilender Zellpopulatio -
nen nach ALS-Gabe Folgeerscheinung einer Immunisierung. Er
bestreitet, daß Transformation und Teilung immunkompetenter
Zellen notwendige Komponenten der ALS-Wirkung sind.

Thierfelder et al. (1970) nehmen an, daß ALS sowohl über
einen zytotoxischen als auch über einen immunogenen Effekt
wirkt. In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß die im -
munsuppressive Wirkung des Antilymphozytensерums nach Aus -
schaltung seiner Immunogenizität (Toleranzinduktion der
Tiere gegen normales Kaninchenserum) durch den allein zyto -
toxischen Einfluß geringer als bei intoleranten Mäusen war.

II. Einfluß von ALS auf Knochenmark, Milz und peripheres Blut

1. Knochenmark

Der Einfluß von Antilymphozytenserum auf das hämopoetische System in vivo setzt sich aus zwei Komponenten zusammen :

1. Eine direkte Wirkung auf Zellen im Knochenmark.
2. Eine indirekte Beeinflussung der Knochenmarkszellen als reaktive Antwort des hämopoetischen Organs auf die periphere Wirkung von ALS.

Eine direkte Wirkung von ALS auf Knochenmarkszellen ist nur dann vorstellbar, wenn das Serum in das blutbildende Organ eindringen kann. Durch Immunofluoreszenzstudien mit radioaktiv markiertem ALS konnten Denman und Frenkel (1968 a) die Penetration einer geringen ALS-Menge in das Knochenmark nachweisen.

Die ALS-induzierten Veränderungen des Zellbilds im Knochenmark waren der Gegenstand der Berichte mehrerer Autoren. Bei in vitro-Inkubation von Knochenmarkszellen mit ALS beobachteten de Meester et al. (1968) und Lemenova und Chertkov (1971) eine starke Lymphopenie und Erythroblastopenie; ein Befund, der von Thierfelder et al. (1968) auch als in vivo - Effekt beschrieben wurde. Umfangreiche semiquantitativ zytologische Untersuchungen über den Einfluß von ALS-Behandlung auf hämopoetisches Gewebe liegen von Rodriguez-Paradisi et al. (1971) vor. Danach fand sich eine Verminderung der absoluten Zahl der Knochenmarkszellen um 16 %, die durch eine ausgeprägte Lymphopenie mit herabgesetzter Erythroblasten- und Megakaryozytenzahl bedingt war. Ein deutlicher Abfall

der Lymphozyten im Knochenmark bei ALS-behandelten Versuchstieren zeigte sich auch bei den histopathologischen Studien von Taub und Lance (1968 a). Im Gegensatz zu den oben erwähnten Befunden aber stellten die Autoren eine Hyperplasie erythrozytärer Vorstufen fest.

Die in zellmorphologischen Untersuchungen mehrfach bestätigte Abnahme der Stammzellaktivität im Knochenmark läßt sich auch mit den CFU-Methoden bestimmen. Bei mit der CFU-Milz-Methode durchgeführten Versuchen erhielten de Meester et al. (1968) eine 50 %-ige Reduktion der oberflächlich sichtbaren Milzkolonien, die sich durch transplantierte Knochenmarkszellen bildeten. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Field und Gibbs (1968), indem sie Knochenmarkszellen vor der Transplantation in mit supraletalen Mylerandosen behandelte Empfängertiere mit ALS inkubierten. Die Beobachtung, daß der CFU-Gehalt nach ALS-Applikation in stärkerem Maß abnahm als die übrige Knochenmarkszellpopulation führte de Meester et al. zu der Ansicht, daß die Behandlung mit dem Antiserum eine scheinbar selektive Ausschaltung der koloniebildenden Stammzellen verursacht hatte.

Für die hier dargelegten Untersuchungen wurde die von Wor-ton et al. (1967) modifizierte CFU-Kultur-Methode nach Bradley und Metcalf (1966) und Pluznik und Sachs (1965) gewählt. Diese Versuchsanordnung besitzt gegenüber der CFU-Milz-Methode mehrere Vorteile. So ist sie technisch einfacher durchführbar und ergibt höhere Koloniewerte bezüglich der gleichen Zahl eingesetzter Zellen. Mit zusätzlichen

Unsicherheiten ist die von Till und McCulloch (1961) entwickelte CFU-Milz-Methode durch die erheblich voneinander abweichenden Angaben über den Dilutionsfaktor der intravenös injizierten koloniebildenden Zellen belastet. Mاتيoli et al. (1968) ermittelten, daß nur 4 % der injizierten Stammzellen Milzkolonien bildeten; Siminovitch und Mitarbeiter (1963) nahmen einen Fraktionswert von 17 % an. Demgegenüber ist die aus den eigenen Versuchsdaten erkennbare geringe Variationsbreite der Koloniezahlen eine Erfahrung mit der CFU-Kultur-Methode, die in den Veröffentlichungen anderer Autoren allgemeine Bestätigung findet.

In enger Übereinstimmung mit den von de Meester et al. (1968) erhaltenen Resultaten zeigte sich bei den ALS-behandelten Tieren eine Abnahme der Koloniezahlen im Knochenmark um 50 %. Untersuchungen von McNeill (1970) mit der Agar-Kultur-Technik beschrieben den in vivo-Effekt von Freundschem Adjuvans auf die CFU-Konzentrationen in Milz, Knochenmark und peripherem Blut. Ein- bis zweiwöchige intraperitoneale Injektionen mit Freundschem Adjuvans in CBL-Mäuse führten zu einem deutlichen Anstieg der Koloniezahlen in Milz und Blut bei nur geringer Steigerungsrate im Knochenmark. Die Gabe von Antilymphozytenserum oder ähnlich antigen wirksamer Substanzen verursacht also eine signifikante Abnahme oder eine im Vergleich zu anderen Organen des hämopoetischen Systems nur geringe Steigerung der CFU-Konzentrationen im Knochenmark.

2. Milz

In der Milz fanden Taub und Lance (1968 a) bei der histologischen Auswertung ihrer an ALS-behandelten Tieren durchgeführten Experimente eine starke Abnahme der kleinen Lymphozyten in den periarteriolenären Regionen der weißen Pulpa. Die untersuchten Milzen waren vergrößert und wiesen eine generalisierte follikuläre Hyperplasie auf, die von einer Vermehrung der Immunoblasten und Plasmazellen im Follikelzentrum und an dessen Rand begleitet war. Außerdem stellten Taub und Lance eine nach ALS-Gabe auftretende Erythroblastose in der roten Pulpa fest.

Rodriguez-Paradisi et al. (1971) konnten diese Ergebnisse bei ihren zytologischen Studien über den in vivo-Einfluß des Antilymphozytenserums auf hämopoetisches Gewebe bestätigen. Sie beobachteten, daß ALS-Behandlung die Milzindices (Quotient aus Milzgewicht und dem Gewicht der linken Niere) um nahezu 100 % steigerte. Der erythroblastotische Effekt von ALS blieb auch nach Entfernung der Hämagglutinine aus dem verwendeten Serum bestehen und ließ sich daher nicht auf eine unmittelbar ALS-bedingte Zellaktivierung zurückführen.

Autoradiographische Befunde bildeten die Basis der Versuche mit ALS-behandelten Ratten von Denman und Frenkel (1968 b). Die morphologische Differenzierung der Zellpopulationen in der Milz ergab eine deutlich vermehrte Zahl proliferierender Retikulozyten, die an der verstärkten Intensität Tritium-markierten Thymidins in diesen Zellen ablesbar war. Der Großteil der radioaktive Substanzen inkorporierenden Zellen wur -

de von den Autoren als Vorläufer kleiner Lymphozyten identifiziert.

Die Stammzellveränderungen in der Milz nach wiederholten ALS-Injektionen wurden auch von Ledney (1967) mit Hilfe der CFU-Milz-Methode nachgewiesen. Er beschrieb eine signifikante Erhöhung des CFU-Gehalts in letal bestrahlten Mäusen, denen Milzzellen syngener ALS-behandelter Spendertiere übertragen worden waren. Der Autor vertrat die Auffassung, daß die Milzzellen ALS-behandelter Mäuse in ihrer proliferativen Kapazität den Knochenmarkszellen normaler Mäuse ebenbürtig sind. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von de Meester et al. (1968) erhielt Ledney aber eine ähnliche Steigerung der CFU-Werte nach ALS-Gabe und Knochenmarkstransplantation. Die Beurteilung dieser kontrastierenden Befunde ist nur schwer möglich, da Ledney keine weiteren Versuchsdaten mitteilte. De Meester et al. konnten ihre Ergebnisse in mehreren Experimenten reproduzieren. Die Aussagen von Ledney (1967) über ALS-Behandlung und Milz-zelltransplantation korrelieren mit den durch die Kulturmethode ermittelten Koloniezahlen. Bei den Versuchen mit ALS-behandelten C3H-Mäusen zeigte sich ein Anstieg des CFU-Gehalts der Milz um 45 %.

3. Peripheres Blut

Mit der Auswirkung antigener Stimulation auf zirkulierende hämopoetische Stammzellen befaßten sich die Arbeiten von Barnes und Loutit (1967 a und b). Bei den Experimenten bedienten sie sich der CFU-Milz-Methode nach Till und McCulloch,

die nach Übertragung von Knochenmarkszellen auf supralethal bestrahlte Empfängertiere das Auftreten von Kolonien aus proliferierendem hämopoetischem Gewebe an der Milzoberfläche dieser Tiere beobachtet hatten. Koloniebildende Stammzellen müssen auch im peripheren Blut von Mäusen vorhanden sein, da ihre Leukozyten in ausreichender Zahl knochenmarksdepressiv behandelte Tiere rekolonisieren (Goodman und Hodgson 1962) und zur Bildung endogener Milzkolonien (Cole 1963) stimulieren können. Die Konzentration der CFU-Zellen im peripheren Blut unbehandelter Mäuse ist jedoch wesentlich niedriger als in Knochenmark und Milz. Barnes und Loutit gelang es, 7 bis 10 Tage nach einmaliger Injektion von Pertussis-Impfstoff eine mehr als zehnfache Erhöhung des normalerweise sehr geringen CFU-Gehalts im peripheren Blut nachzuweisen. Ein deutlicher Anstieg des CFU-Gehalts im peripheren Blut war auch nach Behandlung mit ALS feststellbar (Chertkov et al. 1972); bei den eigenen Versuchen fand sich eine Zunahme der koloniebildenden Zellen um 30 %.

Im Vergleich zu den von Bradley et al. (1971) revidierten Schätzwerten für die durchschnittlichen CFU-Konzentrationen in hämopoetischen Organen erscheinen Koloniezahlen von $25/1 \times 10^6$ Zellen verhältnismäßig hoch. Diese voneinander abweichenden Befunde könnten durch eine beim Separationsverfahren unterlaufene Kontamination der Leukozytenschicht mit Erythrozyten bedingt sein. McNeill (1970) und Bradley et al. (1971) berichteten, daß ins Kultursystem eingebrachte autologe Erythrozyten die Kolonieproduktion anregten. Sie

äußerten die Vermutung, daß die Erythrozyten Substanzen abgeben, die im Zusammenspiel mit anderen Faktoren des Kulturmediums den proliferativen Anreiz der koloniestimulierenden Aktivität verstärken.

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit dem in vivo - Effekt von Antilymphozytenserum sind Untersuchungsbefunde, die nicht nur die Veränderungen in einem Zielorgan, sondern in der Gesamtheit des hämopoetischen Systems beschreiben. So fanden Denman und Frenkel (1968 b) bei autoradiographischen Studien an ALS-behandelten Ratten eine verstärkte Intensität der Markersubstanz in den Retikulozyten von Thymus, Milz und Knochenmark. Daraus entstand die Vermutung, daß die nach ALS konstant auftretende periphere Lymphopenie eine kompensatorische Hyperplasie lymphozytärer Vorläuferzellen verursacht hatte.

Eine Bestätigung dieser Hypothese gelang Jeejeebhoy und Singla (1972) bei ihren Untersuchungen über die Wirkung von ALS auf immunkompetente Zellen. Sie zeigten, daß Knochenmarks- und Thymuszellen nach ALS-Behandlung in unterschiedlicher Weise als Lymphozyten in Milz, Lymphknoten und peripherem Blut betroffen waren. Während die immunologische Kompetenz der Thymuszellen durch ALS unbeeinflusst blieb (Jeejeebhoy 1970), könnte die im Knochenmark feststellbare Abnahme der Immunreaktivität durch die Ausschwemmung immunkompetenter Knochenmarkszellen in andere geschädigte Organe bedingt sein. Ein immunologisches Defizit in der Zellpopula-

tion des Knochenmarks würde dann nachweisbar, wenn mehr auswandernde Zellen durch freie immunsuppressive Antikörper in der Zirkulation inaktiviert werden als neugebildete Knochenmarkszellen zur immunologischen Ausreifung fähig wären. Nach Jeejeebhoy und Singla wurden die bei ALS-behandelten Tieren beobachteten Schäden an der Lymphozytenbesiedlung von Milz, Lymphknoten und peripherem Blut durch den Nachschub immunkompetenter Zellen aus Thymus und Knochenmark behoben.

Diese Ergebnisse sind auch in Bezug auf die von Levey und Medawar (1967) für den Wirkungsmechanismus von ALS entwickelte Theorie der " sterilen Aktivierung " von Bedeutung. Die Autoren postulierten eine ALS-induzierte sterile Aktivierung lymphatischer Zellen, die mit dem Verlust ihrer immunologischen Funktionsfähigkeit einhergeht. Die Hypothese stützte sich vor allem auf die histologisch nachgewiesene Hyperplasie des lymphatischen Systems nach ALS-Behandlung und auf die Fähigkeit von Antileukozytenserum, menschliche Lymphozyten in vitro zur Transformation anzuregen (Gräsebeck et al. 1964). Untersuchungen von Denman et al. (1968) ergaben, daß Lymphozyten in vivo nicht durch direkten Angriff von ALS zu Blastenzellen umgebildet werden. Sie erzeugten durch die Injektion von Pertussis-Impfstoff bei Mäusen eine starke Lymphozytose im peripheren Blut und gaben dann Antilymphozytenserum. Trotz eines deutlichen Abfalls der Lymphozytenzahl im Zeitraum von 24 Stunden ließen sich Blastenzellen im Blut weder morphologisch noch durch Markierung mit radioaktivem Thymidin entdecken.

Zweifel an der Theorie der "sterilen Aktivierung" schei -
nen daher berechtigt; es dürfte sich bei der Bildung der
Blastenzellen weniger um einen Primäreffekt als um einen
kompensatorischen Sekundäreffekt der ALS-Behandlung han -
deln.

Resultate von Experimenten mit Knochenmarksschimären (Oso -
ba 1968) wiesen darauf hin, daß eine nahe Verwandtschaft
zwischen den Vorläuferzellen des immunologischen und mye -
loischen Systems besteht. Die von Jeejeebhoy und Singla
(1972) über die Wirkung von ALS auf immunkompetente Zel -
len ermittelten Versuchsdaten geraten so in enge Beziehung
zu den Studien von Rodriguez-Paradisi et al. (1971) über
den in vivo-Effekt von Antilymphozytenserum auf hämopoe -
tisches Gewebe. Bei den mit zytologischen Methoden ausge -
werteten Versuchen beobachteten die Autoren einen Abfall
der Lymphozyten, Erythroblasten und Megakaryozyten im
Knochenmark und Erythroblastose und Megakaryozytose in der
Milz. Sechstägige Behandlung mit ALS verminderte die ab -
solute Zahl der Knochenmarkszellen um 16 % und ließ die
Milzindices um 100 % ansteigen. Absolute und relative Zell -
zählungen bestimmten Rodriguez-Paradisi et al. zu der Auf -
fassung, daß unter dem Einfluß von ALS eine Verschiebung
von Erythroblasten und Megakaryozyten aus dem Knochenmark
in die Milz stattfindet.

Die hier gewonnenen Ergebnisse legen einen analogen Me -
chanismus für das Verhalten der in der Kultur koloniebil -

denden Zellen nahe. Einer deutlichen Abnahme der Kolonie - zahl im Knochenmark bei ALS-behandelten Mäusen steht eine ebenso signifikante Steigerung der CFU-Konzentration in Milz und peripherem Blut gegenüber. Eine zusammenfassende Interpretation der Versuchsergebnisse läßt in Anlehnung an die von Rodriguez-Paradisi et al. (1971) entwickelte Hypothese den Schluß zu, daß auch die koloniebildenden Zellen dem Weg der Zellverschiebung aus dem Knochenmark in die Milz folgen. Die Stammzellverschiebung erklärt sich als kompensatorische Reaktion auf die oft beschriebenen ALS-induzierten peripheren Zellverluste. Diese Zellverluste könnten eine gesteigerte Neubildungsrate hämopoetischer Zellen hervorrufen, sie könnten die Ausschwemmung multipotenter myeloischer Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut auslösen, während die Milz als Auffang - stelle für die zirkulierenden Stammzellen dient.

Die angeführte Theorie eröffnet auch eine Möglichkeit der klinischen Anwendung. Die Bedeutung der Knochenmarkstransplantation bei der Therapie hämatologischer Erkrankungen wie der Knochenmarksaplasie oder der Leukosen ist in den letzten Jahren ständig gestiegen. Ein weites Anwendungs - gebiet ergibt sich auch in der Organtransplantation. Hier läßt sich durch die Übertragung von Knochenmarkszellen am sichersten eine Toleranz des Empfängerorganismus gegen fremde Organe erzielen. Unter diesen Aspekten muß jede Vereinfachung des Verfahrens der Knochenmarkstransplanta -

tion vorteilhaft erscheinen. McCredie et al. (1971) wiesen das Vorkommen von koloniebildenden Zellen im peripheren Blut des Menschen nach und äußerten die Vermutung, daß die Transfusion ausreichender Leukozytenzahlen bei der Therapie ernster myelosuppressiver Zustände ebenso wirksam wie die Transplantation von Knochenmarkszellen sei. Durch eine ALS-Vorbehandlung des Spenders könnten die benötigten hämopoetischen Zellen mit der Blutentnahme und nachfolgender Anreicherung durch fraktionierte Zellseparation (Dicke et al. 1968 und 1969) gewonnen werden. Die Nachteile der bisher unumgänglichen Knochenmarkspunktion wären so vermeidbar. Voraussetzung für diese Anwendbarkeit wäre allerdings der noch zu erbringende Beweis der Übertragbarkeit der vorliegenden Versuchsergebnisse auf den Menschen und die Entwicklung eines von schädigenden Nebenwirkungen freien Antilymphozytenserums.

Zusammenfassung

C3H-Mäusen wurden an sechs aufeinanderfolgenden Tagen je -
weils 0,25 ml Antilymphozytenserum intraperitoneal injiziert.
Mit der CFU-Kultur-Methode wurde die Wirkung der ALS-Behand -
lung auf koloniebildende Zellen in Knochenmark, Milz und pe -
ripherem Blut untersucht.

1. Im Knochenmark wurde bei den ALS-behandelten Versuchs -
tieren eine 50 %-ige Abnahme der koloniebildenden Zel -
len festgestellt.
2. In der Milz zeigte sich nach den ALS-Injektionen eine
45 %-ige Zunahme des CFU-Gehalts.
3. Im peripheren Blut wurde die Konzentration der kolonie -
bildenden Zellen unter dem Einfluß von ALS um 30 % ge -
steigert.

Eine zusammenfassende Interpretation der Versuchsergebnisse
läßt den Schluß zu, daß auch die koloniebildenden Zellen dem
für Erythroblasten und Megakaryozyten nachgewiesenen Weg der
Zellverschiebung aus dem Knochenmark in die Milz folgen. Die
Stammzellverschiebung ist als kompensatorische Reaktion auf
die ALS-induzierten peripheren Zellverluste zu verstehen.
Diese Zellverluste könnten eine gesteigerte Neubildungsrate
hämo-poetischer Zellen hervorrufen und die Ausschwemmung mul -
tipotenter myeloischer Zellen aus dem Knochenmark in das pe -
riphere Blut auslösen, während die Milz als Auffangstelle
für die zirkulierenden Stammzellen dient.

Literaturverzeichnis

1 Anderson, James, Woodruff:

Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on skin homograft survival and the blood lymphocyte count in rats, Lancet i, 1126 (1967)

2 Austin, McCulloch, Till:

Characterization of the factor in L-cell conditioned medium capable of stimulating colony formation by mouse marrow cells in culture, J. cell. Physiol. 77, 121 (1971)

3 Barnes, Loutit:

Haemopoietic stem cells in the peripheral blood, Lancet ii, 1138 (1967)

4 Barnes, Loutit:

Effects of irradiation and antigenic stimulation on circulating haemopoietic stem cells of the mouse, Nature 214, 1142 (1967)

5 Barnes, Evans, Ford, West:

Spleen colonies in mice : Karyotypic evidence of multiple colonies from single cells, Nature 219, 518 (1968)

6 Becker, McCulloch, Till:

Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, Nature 197, 452 (1963)

7 Bradley, Metcalf:

The growth of mouse bone marrow cells in vitro, Austr. J. exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 (1966)

- 8 Bradley, Metcalf, Robinson:
Stimulation by leukaemic sera of colony formation in solid agar cultures by proliferation of mouse bone marrow cells, Nature 213, 926 (1967)
- 9 Bradley, Sumner:
Stimulation of mouse bone marrow colony growth by conditioned medium, Austr. J.exp. Biol. Med. Sci. 46, 607 (1968)
- 10 Bradley, Telfer, Fry:
The effects of erythrocytes on mouse bone marrow colony development in vitro, Blood 38, 353 (1971)
- 11 Brendel, Pichlmayr:
Heterologe Antilymphozytenseren zur Immunsuppression bei Organtransplantationen, DMW 12, 549 (1967)
- 12 Brent, Courtenay, Gowland:
Immunological reactivity of lymphoid cells after treatment with antilymphocytic serum, Nature 215, 1461 (1967)
- 13 Chan, Metcalf:
Inhibition of bone marrow colony formation by normal and leukaemic human serum, Nature 227, 845 (1970)
- 14 Chan, Metcalf, Stanley:
Stimulation and inhibition by normal human serum of colony formation in vitro by bone marrow cells, Brit. J. Haemat. 20, 329 (1971)
- 15 Chertkov, Lemeneva, Mendelevitch, Udalov:
Stimulation of haemopoietic colony formation by antilymphocyte serum, Cell Tissue Kinet. 5, 387 (1972)

16 Cole:

Hemopoietic restoration in lethally x-irradiated mice in -
jected with peritoneal cells,
Am. J. Physiol. 204, 265 (1963)

17 De Meester, Anderson, Shaffer:

The effect of heterologous anti-lymphocyte serum on mouse
hemopoietic stem cells, J. exp. Med. 127, 731 (1968)

18 Denman, Frenkel:

Mode of action of antilymphocyte globulin I. The distri -
bution of rabbit antilymphocyte globulin injected into
rats and mice, Immunology 14, 107 (1968 a)

19 Denman, Frenkel:

Mode of action of antilymphocyte globulin II. Changes in
the lymphoid cell population in rats treated with anti -
lymphocyte globulin, Immunology 14, 115 (1968 b)

20 Denman, Denman, Holborow:

Immunosuppressive effects of lymphoid cell proliferation
in mice receiving anti-lymphocyte globulin,
Nature 217, 177 (1968)

21 Dicke, van Hooft, van Bakkum:

The selective elimination of immunologically competent
stem cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures
II. Mouse spleen cell fractionation on a discontinuous
albumin gradient, Transpl. 6, 562 (1968)

22 Dicke, Tridante, van Bakkum:

wie 21 III. In vitro test for detection of immunocom -
petent cells in fractionated mouse spleen cell suspen -
sions and primate bone marrow suspensions,
Transpl. 8, 422 (1969)

- 23 Dicke, Platenburg, van Bekkum:
Colony formation in agar : In vitro assay for haemopoietic stem cells, Cell Tissue Kinet. 4, 463 (1971)
- 24 Everett, Schwarz, Tyler, Perkins:
Observations relative to the mechanism of action of anti - lymphocyte serum, Fed. Proc. 29, 212 (1970)
- 25 Field, Gibbs:
Cross-reaction of antilymphocyte serum with haemopoietic stem cells, Nature 217, 561 (1968)
- 26 Foster, Metcalf, Robinson, Bradley:
Bone marrow colony stimulating activity in human sera, Brit. J. Haemat. 15, 147 (1968)
- 27 Foster, Metcalf, Kirchmyer:
Induction of bone marrow stimulating activity by a filterable agent in leukaemic and normal mouse serum, J. exp. Med. 127, 853 (1968)
- 28 Fowler, Wu, Till, McCulloch, Siminovitch:
The cellular composition of hemopoietic spleen colonies, J. cell. Physiol. 69, 65 (1967)
- 29 Goodman, Hodgson:
Repopulating CFU in irradiated mice, Blood 19, 702 (1962)
- 30 Gräsbeck, Nordman, de la Chapelle:
The leukocyte mitogenic effect of serum from rabbits immunized with human leukocytes, Acta med. scand. 412, 39 (1964)
- 31 Gray, Monaco, Wood, Russell:
Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice
I. In vivo and in vitro properties, J. Immunol. 96, 217 (1966)

32 Hulliger, Blazkovec:

A simple and efficient method of separating peripheral -
blood leukocytes for in vitro studies,
Lancet i, 1304 (1967)

33 Ichikawa, Pluznik, Sachs:

In vitro control of the development of macrophage and gra -
nulocyte colonies, Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 488 (1966)

34 Ichikawa, Pluznik, Sachs:

Feedback inhibition of the development of macrophage and
granulocyte colonies I. Inhibition by macrophages,
Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1480 (1967)

35 Iscove, Senn, Till, McCulloch:

Colony formation by normal and leukaemic human marrow cells
in culture : Effect of conditioned medium from human leuko -
cytes, Blood 37, 1 (1971)

36 Iwasaki, Porter, Amend, Marchioro, Zuhlke, Starzl:

The preparation and testing of horse anti-dog and anti -
human antilymphoid plasma or serum and its protein frac -
tions, Surg. Gynecol. Obstetr. 124, 1 (1967)

37 Jeejeebhoy, Vela-Martinez:

Studies on the mode of action of heterologous anti-lympho -
cyte plasma II. The effect of anti-lymphocyte plasma on
lymphocyte counts, Transpl. 6, 149 (1968)

38 Jeejeebhoy:

The effect of heterologous anti-lymphocyte serum on lym -
phocytes of thymus and bone marrow origin,
J. exp. Med. 132, 963 (1970)

39 Jeejeebhoy, Singla:

Mode of recovery from the effects of heterologous anti - lymphocyte serum II. Recovery of the cells involved in antibody production, Immunology 22, 801 (1972)

40 Jooste, Lance, Levey, Medawar, Ruskiewicz, Sharman, Taub:
Notes on the preparation and assay of antilymphocytic se - rum for use in mice, Immunology 15, 697 (1968)

41 Juraskova, Tkadlecek:

Character of primary and secondary colonies of haemato - poiesis in the spleen of irradiated mice,
Nature 206, 951 (1965)

42 Lance, Medawar:

The use of ALS to abet the development of transplantation tolerance in adult mice,
Proc. Roy. Soc. B. 173, 447 (1969)

43 Lance:

The mechanism of action of antilymphocyte serum : Studies of antibody eluate, J. exp. Med. 130, 49 (1969)

44 Lance :

The selective action of antilymphocyte serum on recircu - lating lymphocytes, Clin. exp. Immunol. 6, 789 (1970)

45 Ledney:

Influence of antilymphocyte serum on haemopoietic proli - feration in the mouse as measured by spleen weight and CFU assays, Exp. hemat. 14, 42 (1967)

46 Ledney, van Bekkum:

Suppression of acute secondary disease in the mouse with antilymphocyte serum, Advance in Transplantation S. 441, E. Munksgaard, Copenhagen (1967)

- 47 Ledney:
Endogenous spleen colonies and spleen weight in irradiated mice treated with antilymphocyte serum,
Exp. hemat. 20, 15 (1970)
- 48 Lemenova, Chertkov:
Effect of anti-lymphocyte serum on haemopoietic stem cells,
Probl. Hemat. N 4, 17 (1971)
- 49 Leuchars, Wallis, Davies:
Mode of action for antilymphocyte serum,
Nature 219, 1325 (1968)
- 50 Levey, Medawar:
Some experiments on the action of antilymphoid antisera,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 129, 164 (1966 a)
- 51 Levey, Medawar:
Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum,
Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1130 (1966 b)
- 52 Levey, Medawar:
Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum, Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 470 (1967)
- 53 Lewis, Trobaugh:
Haematopoietic stem cells, Nature 204, 589 (1964)
- 54 Martin, Miller:
Cell to cell-interaction in the immune response IV. Site of action of antilymphocyte globulin,
J. exp. Med. 128, 855 (1968)
- 55 Matioli, Vogel, Niewisch:
The dilution factor of intravenously injected hemopoietic stem cells, J. cell. Physiol. 72, 229 (1968)

56 McNeill:

Antigenic stimulation of bone marrow colony forming cells

I. Effect of antigens on normal bone marrow cells in vitro, Immunology 18, 39 (1970)

57 McNeill:

wie 56 II. Properties of a serum factor responsible for antigenic enhancement of colonies,

Immunology 18, 49 (1970)

58 McNeill:

wie 56 III. Effect in vivo, Immunology 18, 61 (1970)

59 Metcalf, Foster:

Bone marrow colony-stimulating activity of serum from mice with viral-induced leukemia,

J. Nat. Cancer Inst. 39, 1235 (1967 a)

60 Metcalf, Foster:

Behaviour on transfer of serum stimulated bone marrow colonies, Proc. Soc. exp. Biol. 126, 758 (1967 b)

61 Metcalf, Bradley, Robinson:

Analysis of colonies developing in vitro from mouse bone marrow cells stimulated by kidney feeder layers or leukemic serum, J. cell. Physiol. 69, 93 (1967)

62 Metcalf:

Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells II. Action of colony-stimulating factor, J. cell. Physiol. 76, 89 (1970)

63 Metcalf, Chan, Gunz, Vincent, Ravich:

Colony-stimulating factor and inhibitor levels in acute granulocytic leukemia, Blood 38, 143 (1971)

64 Metcalf:

Antigen-induced proliferation in vitro of bone marrow pre -
cursors of granulocytes and macrophages,
Immunology 20, 727 (1971)

65 Monaco, Wood, Gray, Russell:

Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice
II. Effect on the immune response,
J. Immunol. 96, 229 (1966 a)

66 Monaco, Abbott, Othersen, Simmons, Wood, Flax, Russell:

Antiserum to lymphocytes : Prolonged survival of canine
renal allografts, Science 153, 1264 (1966 b)

67 Osoba:

Kinetics of the recovery of colony-forming units and pre -
cursors of antigen-sensitive cells in radiation chimeras,
Fed. Proc. 27, 672 (1968)

68 Paran, Sachs:

The continued requirement for inducer for the develop -
ment of macrophage and granulocyte colonies,
J. cell. Physiol. 72, 247 (1968)

69 Paran, Sachs:

The single cell origin of normal granulocyte colonies in
vitro, J. cell. Physiol. 73, 91 (1969)

70 Paran, Ichikawa, Sachs:

Feedback inhibition of the development of macrophage and
granulocyte colonies II. Inhibition by macrophages,
Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 81 (1969)

- 71 Paron, Sachs, Barak, Resnitzki:

In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients, Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1542 (1970)

- 72 Parrot, Sousa, East:

Thymus dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice, J. exp. Med. 123, 191 (1966)

- 73 Pichlmayr:

Herstellung und Wirkung heterologer Antihundelymphozytenseren, Z. ges. exp. Med. 143, 161 (1967)

- 74 Pluznik, Sachs:

The cloning of normal mast cells in tissue culture, J. cell. Comp. Physiol. 66, 319 (1965)

- 75 Pluznik, Sachs:

The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium, Exp. Cell Res. 43, 553 (1966)

- 76 Robinson, Metcalf, Bradley:

Stimulation by normal and leukemic mouse sera of colony formation in vitro by mouse bone marrow cells, J. cell. Physiol. 69, 83 (1967)

- 77 Robinson, Stanley, Metcalf:

Stimulation of bone marrow colony growth in vitro by human urine, Blood 33, 396 (1969)

- 78 Rodriguez-Paradisi, Thierfelder, Götze, Eulitz, Beil:
Cytology and histology of haemopoietic cell transplanta -
tion under the influence of antilymphocyte serum in mice
I. In vivo effect of antilymphocyte globulin on haemo -
poietic tissue, Clin. exp. Immunol. 8, 107 (1971)
- 79 Siminovitch, McCulloch, Till:
The distribution of colony-forming cells among spleen
colonies, J. cell. Comp. Physiol. 62, 327 (1963)
- 80 Stanley, McNeill, Chan:
Antibody production to the factor in human urine stimu -
lating colony formation by mouse bone marrow cells,
Brit. J. Haemat. 18, 585 (1970)
- 81 Stanley, Bradley, Sumner:
Properties of the mouse embryo conditioned medium factors
stimulating colony formation by mouse bone marrow cells
in vitro, J. cell. Physiol. 78, 301 (1971)
- 82 Sutherland, Till, McCulloch:
A kinetic study of the genetic control of hemopoietic
progenitor cells assayed in culture and in vivo,
J. cell. Physiol. 75, 267 (1970)
- 83 Taub, Lance:
Histopathological effects in mice of heterologous anti -
lymphocyte serum, J. exp. Med. 128, 1281 (1968 a)
- 84 Taub, Lance:
Effects of heterologous anti-lymphocyte serum on the
distribution of ⁵¹Cr-labelled lymph node cells in mice,
Immunology 15, 633 (1968 b)

- 85 Thierfelder, Möller, Kimura, Dörmer, Eulitz, Mempel:
Die Wirkung von heterologem ALS auf die homologe und heterologe Knochenmarksübertragung bei supraletal bestrahlten Mäusen, Blut 15, 225 (1967)
- 86 Thierfelder, Möller, Kimura, Dörmer, Eulitz:
Die Zellspezifität heterologer, sogenannter antilymphozytärer Antiseren vom Kaninchen,
Z. ges. exp. Med. 147, 44 (1968)
- 87 Thierfelder, Mempel, Rodriguez-Paradisi:
Knochenmarkstransplantation und Antilymphozytenserum, Hämatologie und Bluttransfusion 8, 198 (1969)
- 88 Thierfelder, Götze, Eulitz:
Die Wirkung von Kaninchen-anti-Maus-Lymphozyten-Gammaglobulin auf die chronische Sekundärkrankheit bei gegen Kaninchen-Normal-Gammaglobulin toleranten Knochenmarkspendern, Klin. Wschr. 48, 1464 (1970)
- 89 Till, McCulloch:
A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells,
Rad. Res. 14, 213 (1961)
- 90 Turk, Willoughby:
Central and peripheral effects of antilymphocyte antisera, Lancet i, 249 (1967)
- 91 Woodruff, Anderson:
The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocytic serum on the survival of skin, Nature 200, 702 (1963)

- 92 Woodruff, Reid, James:

The effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on human lymphocytes in vitro,

Nature 215, 591 (1967)

- 93 Worton, McCulloch, Till:

Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture,

J. cell. Physiol. 74, 171 (1969)

- 94 Wu, Till, Siminovitch, McCulloch:

A cytological study of the capacity for differentiation of normal haemopoietic colony-forming cells,

J. cell. Physiol. 69, 177 (1967)

- 95 Wu, Siminovitch, Till, McCulloch:

Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture,

Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 1209 (1968)

Herrn Priv.-Doz. Dr. S. Thierfelder möchte ich für die Überlassung des Themas und für den Arbeitsplatz danken.

Allen Mitarbeitern der Abt. f. Immunologie, besonders Herrn Dr. W. Mempel, darf ich für Unterstützung und Ratschläge Dank sagen.

Lebenslauf

19.3.1948	geboren als Sohn des Facharztes für Röntgenologie Dr. Max Abb und der Fachärztin für Neurologie Dr. Lena Abb-Rühsen, geb. Rühsen in Würzburg
1954 - 1958	Besuch der Volksschule in Bad Kis - singen
1958 - 1960	Neusprachl. Gymn. in Bad Kissingen
1960 - 1967	Landerziehungsheim Schondorf/Ammersee
7.7.1967	Reifeprüfung
1967 - 1973	Medizinstudium an der Universität München
April 1970	Ärztliche Vorprüfung
Juni 1973	Staatsexamen
Juli 1973	ECFMG - Examen

